

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 4 月 29 日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/035788 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18,
C12M 1/00, G01N 33/53, 37/00 // C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013276

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 16 日 (16.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-305318

2002 年 10 月 21 日 (21.10.2002) JP

(OHARA, Osamu) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県 木更
津市 かずさ鉄足二丁目 6 番地 7 財団法人かずさ
ディー・エヌ・エー研究所内 Chiba (JP). 長瀬 隆弘
(NAGASE, Takahiro) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県 木更
津市 かずさ鉄足二丁目 6 番地 7 財団法人かずさ
ディー・エヌ・エー研究所内 Chiba (JP). 菊野 玲
子 (KIKUNO, Reiko) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県 木更
津市 かずさ鉄足二丁目 6 番地 7 財団法人かずさ
ディー・エヌ・エー研究所内 Chiba (JP).(74) 代理人: 阿部 正博 (ABE, Masahiro); 〒274-0825 千葉
県 船橋市 前原西二丁目 1 4 番 1 号 ダイアパレス津
田沼 1001 号 Chiba (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人
かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA
RESEARCH INSTITUTE FOUNDATION) [JP/JP]; 〒
292-0812 千葉県 木更津市 かずさ鉄足二丁目 6 番地
7 Chiba (JP). 株式会社 プロテイン・エクスプレス
(PROTEINEXPRESS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒288-0041
千葉県 銚子市 中央町 2-1 1 Chiba (JP).(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小原 收

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL GENES AND PROTEINS ENCODED THEREBY

(54) 発明の名称: 新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質

(57) Abstract: Novel DNAs containing a protein-encoding region are directly cloned from cDNA libraries originating in human adult whole brain and human fetal whole brain, the base sequences thereof are determined and the functions thereof are identified. Namely, a DNA containing a base sequence encoding the following polypeptide (a) or (b): (a) a polypeptide comprising an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1; and (b) a polypeptide comprising an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 by deletion, substitution or addition of some of the amino acids and having a biological activity substantially equivalent to the function of the polypeptide (a); a recombinant polypeptide encoded by the above DNA; and a protein containing the polypeptide.

(57) 要約: ヒト成人全脳及びヒト胎児全脳由来の cDNA ライブラリーからタンパク質をコードしている領域を含む新規な DNA を直接クローニングし、それらの塩基配列を決定し、更にそれらの機能を同定すること。以下の (a) または (b) のポリペプチドをコードする塩基配列を含む DNA: (a) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(b) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、(a) のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド、上記 DNA にコードされる組換えポリペプチド、および該ポリペプチドを含むタンパク質。

WO 2004/035788 A1

明細書

新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質

技術分野

本発明は、DNAおよび該DNAを含む遺伝子、並びに該DNAにコードされる組換えポリペプチドおよび該ポリペプチドを含む新規組換えタンパク質に関し、より詳細には、Quiescin Q6 ファミリーに属すると考えられる新規なタンパク質の遺伝子及びそれにコードされるタンパク質に関する。

背景技術

ヒトゲノム計画における大規模シーケンシングによって、ヒトゲノムの塩基配列に関する膨大な情報が得られ、日々解析が進められている。

ヒトゲノム計画の最終目的は単にゲノム全塩基配列を決定することではなく、その構造情報、即ち、DNAの塩基配列情報からヒトのさまざまな生命現象を読み解くことにあろう。

[非特許文献1]

Donald L. Coppock他 著、Genomics 54, "The Quiescin Q6 Gene (QSCN 6) is a Fusion of Two Ancient Gene Families: Thioredoxin and ERV1", 1998, p.460-468

[非特許文献2]

Beatrice Benayoun他 著、The Journal of Biological Chemistry Vol.276, No.17, "Rat Seminal Vesicle FAD-dependent Sulfhydryl Oxidase", 2001, p.13830-13837

ヒトゲノム配列中でタンパク質をコードしている領域はそのごく一部であり、現在は、ニューラルネットワークや隠れマルコフモデルと呼ばれる情報科学の手法を用いて、そのコード領域の予測が行われている。しかしながら、それらの予測精度はまだ十分なものではない。

発明の開示



今回、本発明者は新規な遺伝子を見出すべく、ヒト成人全脳、及びヒト胎児全脳由来のcDNAライブラリーから、タンパク質をコードしている領域を含む新規なDNAを直接クローニングすることに成功し、それらの塩基配列を決定して本発明を完成させた。

即ち、本発明は第一の態様において、以下の(a)または(b)：

(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、(a)のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド、

をコードする塩基配列を含むDNAに係る。このようなDNAの例として、限定するものではないが、配列番号1の塩基配列を含有するDNAが挙げられる。

また本発明は第二の態様において、本発明の第一の態様であるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、上記(a)のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性（機能）を有するポリペプチドをコードするDNAに係る。

以上の本発明の第一および第二の態様であるDNAをまとめて、以下「本発明DNA」ともいう。さらに本発明は、本発明DNAに実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNAにも係る。

さらに本発明は第三の態様において、本発明DNAを含む遺伝子構築物に係る。本明細書において「遺伝子構築物」とは、人為的に操作されたあらゆる遺伝子を意味する。遺伝子構築物の例としては、限定するものではないが、本発明DNAまたは本発明DNAのアンチセンスDNAを含むベクター、および本発明DNAの発現ベクターが挙げられる。

本発明は第四の態様において、以下の(a)または(b)：

(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b)配列番号1で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置



換または付加されたアミノ酸配列からなり、(a)のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド、に係る。

また本発明は第五の態様において、本発明の第三の態様である遺伝子構築物にコードされる組換えポリペプチドにも係る。

以上のポリペプチドは、まとめて、以下「本発明ポリペプチド」ともいう。尚、本明細書では、ポリペプチドとは、「あらゆる分子量を有するアミノ酸の重合体」を意味する。本発明はまた、本発明ポリペプチドを含んでなる組換えタンパク質にも係る。前述の定義の通り、本明細書において用語「ポリペプチド」は分子量による制限を課していないため、用語「本発明ポリペプチド」には本発明ポリペプチドを含む組換えタンパク質もまた含まれる。

本発明は第六の態様において、本発明ポリペプチドに対する抗体に係る。

本発明は第七の態様において、本発明DNAを配列させたDNAチップに係る。

本発明は第八の態様において、本発明ポリペプチドを配列させたポリペプチドチップに係る。

本発明は第九の態様において、本発明の第六の態様である抗体を配列させた抗体チップに係る。

本発明は第十の態様において、本発明DNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドに係る。

発明を実施するための最良の形態

本発明DNAは、市販されている(クロンテック社製)ヒト成人全脳及びヒト胎児全脳のmRNAを出発材料として、本発明者が調製したcDNAライブラリーから、cDNA断片として単離した後に、塩基配列を決定し同定したものである。

即ち、具体的には、小原他の方法(DNA Research 4:53-59(1997))に従って調製したヒト成人全脳及びヒト胎児全脳由来のcDNAライブラリーからクローンをランダムに単離する。

これらの末端塩基配列を解析後、クエリーとして既知遺伝子のデータベースにて相同性検索を行い、その結果、新規であることが判明したクローンについて、c



DNAの5'および3'の末端配列をヒトのゲノム配列に対応させ、それらが挟む領域に未知の長鎖遺伝子が確認された場合には、そのcDNAの全長解析をおこなう。

また、短い断片や得られた配列に人工的な間違いが起こらないように十分な注意を払いながら、RACEなどのPCR法を使用することによっても、本発明DNAを含むヒト由来遺伝子の全領域を調製することも可能である。

更に、本発明は、本発明DNAまたは本発明DNAを含む遺伝子構築物を含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該形質転換体を培養し、本発明ポリペプチドもしくは該ポリペプチドを含む組換えタンパク質を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする、本発明ポリペプチドもしくは該ポリペプチドを含む組換えタンパク質、またはその塩の製造方法、および、こうして得られる本発明ポリペプチドもしくは該ポリペプチドを含む組換えタンパク質またはその塩を提供する。

また本発明は、本発明DNAまたは遺伝子構築物を含有してなる医薬、本発明ポリペプチドもしくはその部分ポリペプチドまたは該ポリペプチドを含む組換えタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド(DNA)、本発明DNAに対するアンチセンスヌクレオチド、該ポリヌクレオチドまたはアンチセンスヌクレオチドを含有してなる医薬、本発明ポリペプチドもしくはその部分ポリペプチド、および、該ポリペプチドまたはそれらを含む組換えタンパク質を含有してなる医薬に係る。

また本発明は、本発明DNA、本発明ポリペプチド、および本発明ポリペプチドに対する抗体を配列して作製される、DNAチップ、ペプチドチップ、および抗体チップにも係る。

更に、本発明は、本発明ポリペプチド、その部分ポリペプチドもしくは該ポリペプチドを含む組換えタンパク質またはそれらの塩、またはそれらに対する抗体を用いることを特徴とする、それら物質と特異的に相互作用する物質のスクリーニング方法、スクリーニング用キット、並びに、該スクリーニング方法によって同定される物質(化合物)自体などにも係る。

本発明DNAとしては、前述した本発明ポリペプチドをコードする塩基配列が



らなるものであればいかなるものであってもよい。また、ヒトの脳、または、それ以外の組織、例えば、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、精巣などの細胞・組織に由来するcDNAライブラリーなどから同定・単離されたcDNA、または、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリー作成に使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりトータルRNA画分またはmRNA画分を調製したものをを用いて、直接逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(以下、「RT-PCR法」と略称する)によって増幅することもできる。

本発明DNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、本発明ポリペプチドまたはその部分ポリペプチドをコードするDNAと実質的に相補的な塩基配列を有し、本発明DNAの発現を抑制し得る作用を有する任意のアンチセンスDNAが含まれる。実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明DNAに相補的な塩基配列の全塩基配列または部分塩基配列と好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上、最も好ましくは100%の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。また、これらアンチセンスDNAと同様の作用を有する核酸配列(RNAまたはDNAの修飾体)も本発明でいうアンチセンスオリゴヌクレオチドに含まれる。これらのアンチセンスオリゴヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

配列番号1で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号1で示される全アミノ酸配列との相同性の程度が、全体の平均で約70%以上、好ましくは約80%以上、更に好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上であるアミノ酸配列を意味する。

従って、本発明の配列番号1で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドとしては、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して上記の相同性を有し、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性(機能)を有するポリペプチドを挙げることができる。ここで、実質的に同質とは、それらの活性(機能)が性質



的に同質であることを示す。

また、本発明ポリペプチドには、例えば、配列番号1で示されるアミノ酸配列中の一部(好ましくは、1~20個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個)のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列、或いはそれらを組み合わせたアミノ酸配列からなり、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性(機能)を有するポリペプチドも含まれる。

上記の配列番号1で示されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド、またはその一部のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなるポリペプチドは、例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法、およびPCR法などの当業者に周知の方法を適宜組み合わせて、容易に作成することが可能である。

尚、その際に、実質的に同質の生物学的活性を有するためには、当該ポリペプチドを構成するアミノ酸のうち、同族アミノ酸(極性・非極性アミノ酸、疎水性・親水性アミノ酸、陽性・陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸など)同士の置換が可能性として考えられる。また、実質的に同質の生物学的活性の維持のためには、本発明のポリペプチドに含まれる機能ドメイン内のアミノ酸は保持されることが望ましい。

本発明DNAは、本発明ポリペプチドをコードする塩基配列を含むDNA、及び、本発明の第一の態様であるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチドの機能と同質の生物学的活性(機能)を有するポリペプチドをコードするDNAを包含する。

このようなストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAの例としては、例えば、該DNAの全塩基配列との相同性の程度が、全体の平均で約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上である塩基配列を含有するDNAなどを挙げることができる。

ハイブリダイゼーションは、「分子生物学の最新プロトコール」(Current prot



ocols in molecular biology(Frederick M. Ausubelら編、1987))に記載の方法など、当業界で公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

ここで、「ストリンジェントな条件」とは、例えば、65°Cの1mM EDTA ナトリウム、0.5M リン酸水素ナトリウム(pH7.2)、7%SDS 水溶液中でハイブリダイズさせ、65°Cの1mM EDTA ナトリウム、40mM リン酸水素ナトリウム(pH7.2)、1%SDS 水溶液中でメンブレンを洗浄する条件でのサザンブロットハイブリダイゼーションで本発明DNAプローブにハイブリダイズする程度の条件である。上記以外の条件によっても、同じストリンジェンシーとすることができる。

本発明DNAのクローニングの手段としては、本発明ポリペプチドの部分などの適当な塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明ポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。

ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、上記の「分子生物学の最新プロトコール」(Frederick M. Ausubelら編、1987)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、当該技術分野で公知の方法に従って作成することができる。例えば、(1)本発明DNAまたは本発明DNAを含む遺



伝子を含有するDNA断片を切り出し、(2)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC18、pUC118)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどを利用することができる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応した適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、宿主が大腸菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主が枯草菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

発現ベクターには、以上の他に、所望により当該技術分野で公知の、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製起点などを付加することができる。また、必要に応じて、本発明のDNAにコードされたタンパク質を他のタンパク質(例えば、グルタチオンSトランスフェラーゼおよびプロテインA)との融合タンパク質として発現させることも可能である。このような融合タンパク質は、適当なプロテアーゼを使用して切断し、それぞれのタンパク質に分離することができる。

宿主細胞としては、例えば、エシェリキア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリキア属菌の具体例としては、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*) K12・DH1(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60:160(1968))、JM103(Nucleic Acids Research, 9:309(1981))、JA221(Journal of Molecular Biology, 12



0:517(1978))、およびHB101 (Journal of Molecular Biology, 41:459(1969))
などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス(Bacillus subtilis)MI 1
14 (Gene, 24:255(1983))、207-21 [Journal of Biochemistry, 95:87(19
84)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevi
siae)AH22、AH22R-、NA87-11A、DKD-5D、20B-12な
どのサッカロマイセス、シゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces po
mbe)NCYC1913、NCYC2036、ピヒア・パストリス(Pichia pastori
s)などが用いられる。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムス
ター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損CHO細胞、マ
ウスL細胞、マウスA₁₀T-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒト
FL細胞などが用いられる。

これら宿主細胞の形質転換は、当該技術分野で公知の方法に従って行うことが
できる。例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:2110(1972)、Gene, 17:107(1
982)、Molecular & General Genetics, 168:111(1979)、「酵素学における方法」
(Methods in Enzymology)、第194巻、182-187(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 75:1929(1978)、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコル、263-2
67(1995)(秀潤社発行);およびVirology, 52:456(1973)を参照できる。

このようにして得られた、本発明DNAまたは本発明DNAを含む遺伝子を含
有する発現ベクターで形質転換された形質転換体は、当該技術分野で公知の方法
に従って培養することができる。

例えば、宿主がエシェリキア属菌の場合、培養は通常約15~43°Cで約3~
24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス
属菌の場合、培養は通常、約30~40°Cで約6~24時間行い、必要により通
気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培養は通常、pH約5~8に調整



された培地を用いて約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、pHは約6～8に調整された培地を用いて、通常約30℃～40℃で約15～60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えることもできる。

上記培養物から本発明ポリペプチドまたはタンパク質を分離精製するには、例えば、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗製抽出液を得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100(商標)などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。

こうして得られた本発明ポリペプチドは、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。更に、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に、トリプシンおよびキモトリプシンのような適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。

本発明ポリペプチドまたはその塩の存在は、様々な結合アッセイおよび特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明ポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基($-COOH$)またはカルボキシレート($-COO^-$)であるが、C末端がアミド($-CONH_2$)またはエステル($-COOR$)であってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどのC1-6アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC3-8シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC6-12アリール基、例えば、ベンジル、



フェネチルなどのフェニル-C1-2アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C1-2アルキル基などのC7-14アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが用いられる。

本発明ポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のポリペプチドには、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など)で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン酸残基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上にある、例えばOH、COOH、NH₂、SHなどが適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC1-6アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のポリペプチドの部分ポリペプチドとしては、前記した本発明ポリペプチドの部分ペプチドであって、実質的に同質の活性を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明ポリペプチドの構成アミノ酸配列のうち少なくとも10個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有し、例えば、本発明のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性を有するペプチドなどが用いられる。本発明の部分ポリペプチドとしては、例えば、各機能ドメインを含むものが好ましい。また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基(-COOH)またはカルボキシレート(-COO-)であるが、前記した本発明のポリペプチドのごとく、C末端がアミド(-CONH₂)またはエステル(-COOR)であってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のポリペプチドと同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチド



ドなども含まれる。本発明の部分ペプチドは、例えば、試薬、実験の際の標準物質、または免疫原もしくはその一部として使用することができる。

本発明ポリペプチドまたはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

本発明ポリペプチド、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体は、当該技術分野で公知の化学合成方法を用いて調製することもできる。

例えば、通常市販されているタンパク質合成用樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、当業界において知られた各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、その部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、例えば、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、およびN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドのようなカルボジイミド類に代表されるポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBT, HOObt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または対照とする酸無水物またはHOBTエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行った後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、酸アミド類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール類、スルホキシド類、およびエーテル類など、当業界においてポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。反応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.



5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

原料の各アミノ基、カルボキシル基、およびセリン水酸基などの保護基としても、当該技術分野において、通常使用される基を使用することができる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、当該技術分野において知られたペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)、(1975年)、矢島治明および榊原俊平、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)、矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店に記載された方法が挙げられる。

反応後の精製も公知の方法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明ポリペプチド、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、それらを認識し得るものであれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明ポリペプチド、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明ポリペプチドまたはその部分ペプチドを抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。



本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明ポリペプチドなどを検出するために使用することができる。また、これらを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明ポリペプチドの検出、被検細胞内における本発明ポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

以下に本発明DNA、本発明ポリペプチド、本発明の抗体などの使用についてさらに詳述する。

本発明DNA、本発明DNAのアンチセンスDNA、またはこれらのDNAを含む遺伝子構築物をプローブとして使用することにより、本発明ポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常(遺伝子異常)を検出することができる。

例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法(Genomics, 5:874-879(1989)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:2766-2770(1989))などにより実施することができる。

更に、本発明DNAまたは遺伝子に異常がある場合、欠損している場合あるいは発現量が減少している場合、生体内において正常な機能を発揮できない患者に対しては、公知手段に従ってレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターをベヒクルとして使用する遺伝子治療によって、本発明DNAまたは遺伝子構築物を該患者体内に導入し発現させると効果的であると考えられる。また、発現量が増加しているために正常な機能が発揮できない場合には、アンチセンスの導入が効果的であろう。

本発明DNA、本発明のアンチセンスDNA、または遺伝子構築物を、それらのDNAや構築物を単独、または摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することも可能である。

または上記の疾患の患者に対して本発明のポリペプチドなどを該患者に注入す



ることなどによって、該患者において本発明のポリペプチドなどの機能を発揮させることができるものと考えられる。

更に、本発明の抗体は、公知の方法による被検液中の本発明ポリペプチドなどの定量、特に、モノクローナル抗体を使用したサンドイッチ免疫測定法による定量、および組織染色などによる検出などに使用することができる。それによって、例えば、本発明ポリペプチドなどが関与する疾病の診断を行うことができる。

これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b)₂、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドなどの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、タンパク質量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられる。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、当該技術分野で公知の、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などを用いることができる。

これらの測定・検出方法に関する一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江 寛編、続ラジオイムノアッセイ(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編、酵素免疫測定法(第3版;医学書院、昭和62年発行)、「酵素学における方法」第70巻「免疫化学的技術(パートA)」(Immunochemical Techniques(Part A))、同書第73巻「免疫化学的技術(パートB)」(Immunochemical Techniques(Part B))、同書第74巻「免疫化学的技術(パートC)」(Immunochemical Techniques(Part C))、同書第84巻「免疫化学的技術(パートD:選択された免疫アッセイ)」(Immunochemical Techniques(Part D: Selected Immunoassays))、同書第92巻「免疫化学的技術(パートE:モノクローナル抗体および一般的な免疫アッセイ法)」(Immunochemical Techniques(Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書第121巻「免疫化学的技術(パートI:ハイブリドーマ技術およびモノクローナル抗体)」(I



mmunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

また本発明DNAを配列させて作製したDNAチップは、本発明DNAの変異・多型性の検出、発現量のモニタリングにおいて有用である。DNAチップの一種であるDNAアレイなどに関しては、「DNAマイクロアレイと最新PCR法」(細胞工学別冊 ゲノムサイエンスシリーズ1、村松正明、那波宏之監修、2000年3月16日第1版第1刷発行)などを参照されたい。

さらに本発明ポリペプチドを配列させて作製したポリペプチドチップは、本発明ポリペプチドの発現、相互作用、翻訳後修飾などの機能解析や、タンパク質の同定、精製のための強力なツールとなり得る。

本発明ポリペプチドに対する抗体を配列させて作製した抗体チップは、疾患、障害、その他の生理的現象と本発明ポリペプチドとの相関を解析するために非常に有用である。

これらのチップの作製方法および材料は当業者には公知である。

更に、本発明ポリペプチドなどは、これらと特異的に相互作用する化合物をスクリーニングするための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明ポリペプチド、その部分ペプチドもしくはそれらの塩、又はそれらに対する抗体(以下、「本発明ポリペプチドなど」ともいう)を用いることを特徴とする、該物質またはそれらの塩と特異的に相互作用する化合物のスクリーニング方法、およびそのためのスクリーニング用キットを提供する。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて同定される化合物またはその塩は、本発明ポリペプチドなどと相互作用し、その生物学的活性を調節、阻害、促進、または拮抗などする化合物である。該化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドなどの活性に直接作用するものであってもよいし、本発明ポリペプチドなどの発現に作用することによって間接的に本発明ポリペプチドなどの活性に作用するものであってもよい。該化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容しうる塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがある。



げられる。本発明ポリペプチドなどの生物学的活性を阻害する化合物も上記各種疾病に対する治療・予防剤などの医薬として使用できる可能性がある。

本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUBの命名に関する委員会による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

実施例

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、実施例における各種遺伝子操作は、上記の「分子生物学の最新プロトコル」(Frederick M. Ausubelら編、(1987))に記載されている方法に従った。

(1) ヒト成人全脳及びヒト胎児全脳由来cDNAライブラリーの構築

Not I 部位を有するオリゴヌクレオチド(GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCC(T)₁₅)(インビトロジェン社製)をプライマーとして、ヒト成人全脳およびヒト胎児全脳由来mRNA(クロンテック社製)を鋳型にSuperScriptII逆転写酵素キット(インビトロジェン社製)で2本鎖cDNAを合成した。Sal I 部位を有するアダプター(インビトロジェン社製)をcDNAとライゲーションした。その後、Not I 消化し、1%濃度の低融解アガロース電気泳動により、3 kb以上のDNA断片を精製した。

精製cDNA断片を、Sal I-Not I制限酵素処理したpBluescript IISK+プラスミドとライゲーションした。大腸菌 ElectroMax DH10B株(インビトロジェン社製)にエレクトロポレーション法によりこの組換えプラスミドを導入した。

(2) スクリーニング

ランダムに単離したクローンの末端塩基配列を決定し、得られた配列をクエリーとして相同検索プログラムBLASTN 2.2.1 (Altschul、Stephen F.、Thomas L. Madden、Alejandro A. Schaffer、Jinghui Zhang、Zheng Zhang、Webb Miller、およびDavid J. Lipman (1997))、「ギャップBLASTおよびPSI-BLAS



T: タンパク質データベース検索プログラムの新規作成」(Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs), *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402)を用いて、nr(GenBank+EMBL+DDBJ+PDB配列(但しEST、STS、GSSまたはフェーズ0、1または2のHTGS配列は含まず))データベースに対して相同検索を行った。その結果、相同遺伝子が存在しなかったもの、即ち、新規遺伝子であるものについて、その5'および3'の末端配列を、相同検索プログラムBLASTN2.2.1を用いて、ヒトのゲノム配列(ftp://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens/)に対応させた。

次に、それらが挟むゲノム領域から、Genscanプログラム(Burge, C. and Karlin, S. 1997, Prediction of complete gene structures in human genomic DNA, *J Mol. Biol.*, 268, 78-94、ゲノムから遺伝子を予測するコンピューターソフト)を用いて、コードされる遺伝子を抜き出した。これをクエリーとして、相同検索プログラムBLASTN2.2.1を用いて、mergedb(かずさDNA研究所で決定したヒトのcDNAの配列とGenBankのhomo sapiensデータベースからESTとゲノムを除いたものを重複なく混ぜ合わせた、かずさDNA研究所で独自に作成したDNA配列データベース)に対応させ、新規の長鎖(Genscan予想cdsが1200 bp以上)遺伝子が確認された場合には、cDNAの全長解析をおこなった。

配列決定には、PEアプライドバイオシステム社製のDNAシーケンサー(ABI PRISM377)と同社製反応キットを使用した。大部分の配列はショットガンクローンをダイターミネーター法を用いて決定した。一部の塩基配列については、決定した塩基配列を元にしてオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウォーキング法で決定した。

このようにして新規DNAまたは遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、配列表の配列番号1に示された新規DNAまたは遺伝子を有するクローン「fj03204」が検出された。

(3)本発明DNAの相同性検索

次に、こうして得られた全塩基配列に基づき、クローンのアミノ酸配列を既知配列ライブラリーnrに対して解析プログラムBLASTP 2.2.1(「ギャップBLAS

TおよびPSI-BLAST：タンパク質データベース検索プログラムの新規作成」、前掲)を用いて検索したところ表1に示した各相同遺伝子と相同性を示すことが明らかになった。尚、表1には、これら相同遺伝子に関する情報、即ち、その名称、データベースID、タンパク質長、生物種、及び、記載文献を示す。

[表1]

遺伝子名	データベースID	タンパク質長	生物種	論文
Quiescin Q6	gi 13325075	747	Human	Genomics(1998),54(3);460-8
Quiescin Q6	gi 16758172	570	Rat	J.B.C.(2001),276(17);13830-7
Quiescin Q6	gi 12963609	568	Mouse	Genome Res.(2000),10(10);1617-30

更に、本発明DNAまたは遺伝子と表1に示した各相同遺伝子との相同性に関する各種データを表2にまとめた。これら表中の各項目の意味は以下の通りである。

「Score」この値が高いほど信頼度が高い

「E-value」この値が0に近いほど信頼度が高い

「相同性」相同領域のアミノ酸残基の一致の割合

「相同範囲率」相同遺伝子中の相同領域の割合

[表2]

相 同 領 域					相 同 値			
ク ロ ー ン		相 同 遺 伝 子			Score	E-value	相同性	相同範囲率
起点	終点	生物種	起点	終点				
34	629	Human	12	613	464	e-135	41%(252/611)	81%
23	583	Rat	6	559	474	e-132	44%(246/565)	97%
23	588	Mouse	6	565	483	e-129	45%(257/572)	99%

(4)各種ドメインの検索

次に、クローンに含まれるDNAがコードするアミノ酸配列中から、Pfam 7.6に含まれる検索ツールPfam HMM ver 2.1 Search (HMMPFAM) (Sonnhammer ELL、Eddy SR、Birney E、Bateman A、およびDurbin R (1998)「Pf

am: マルチプル配列アライメントおよびタンパク質ドメインのHMM特性」(Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains), Nucleic Acids Res. 26:320-322)を用いて機能ドメインを検索した。

更に、膜タンパク質予測プログラムであるSOSUI system (ver. 1.0 / 10, Mar., 1996) (Takatsugu Hirokawa, Seah Boon-ChiengおよびShigeki Mitaku, 「SOSUI: 膜タンパク質に関する分類と2次構造予測システム」(SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins), Bioinformatics (以前のCABIOS) 1998 May;14(4):378-379)を用いて膜貫通ドメインを検索した。

これらの検出された機能ドメインおよび膜貫通ドメインをそれぞれのクローンについて表3に示した。

これら表中の各項目の意味は以下の通りである。

「機能ドメイン」 PfamまたはSOSUIにより検出されたドメイン

「起点 (From)」 機能ドメインの起点となるアミノ酸位置

「終点 (To)」 機能ドメインの終点となるアミノ酸位置

「Score(Pfamのみ)」 この値が高いほど信頼度が高い

「Exp(Pfamのみ)」 この値が0に近いほど信頼度が高い

[表3]

fj03204					human quiescin				
機能ドメイン	From	To	Score	Exp	機能ドメイン	From	To	Score	Exp
sosui	29	51			Thioredoxin	39	155	52.5	9e-12
Thioredoxin	60	177	28.7	6.1e-06					
sosui	654	676							

rat quiescin					mouse quiescin				
機能ドメイン	From	To	Score	Exp	機能ドメイン	From	To	Score	Exp
sosui	12	34			sosui	11	33		
Thioredoxin	42	162	49.0	1e-10	Thioredoxin	42	162	45.8	9.9e-10
sosui	63	85			sosui	63	85		



(5)発現部位

RT-PCR ELISAを用いて、組織と脳の部位での発現を調べた結果を表4に示した (Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, Kikuno R, Miyajima N, Tanaka A, Kotani H, Nomura N, Ohara O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XI. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Res. 1998 Oct 30;5(5):277-86.)。

発現量(単位(fg) per ng of poly(A)+ RNA)が0.1未満を + 、0.1以上100未満を ++ 、100以上を +++ で示した。

尚、各組織及び脳の部位の完全標記を表5に示した。

[表 4]

clone name	成人																				胎児	
	組織										脳の領域											組織
	He	Br	Lu	Li	Sm	Ki	Pa	Sp	Te	Ov	Am	Co	Ce	Ca	Hi	Ni	Nu	Th	Sp			
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++		
fj03204	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	

[表 5]

	略記	標記	日本語
組織	Br	Brain	脳
	He	Heart	心臓
	Ki	Kidney	腎臓
	Li	Liver	肝臓
	Lu	Lung	肺臓
	Ov	Ovary	卵巣
	Pa	Pancreas	膵臓
	Sm	S.muscle	骨格筋
	Sp	Spleen	脾臓
	Te	Testis	精巣
脳の領域	Am	B.amygdala	脳の扁桃体
	Ca	B.caudate nucleus	脳の尾状核
	Ce	B.cerebellum	脳の小脳
	Co	B.corpus callosum	脳の脳梁
	Hi	B.hippocampus	脳の海馬
	Ni	B.substantia nigra	脳の黒質
	Nu	B.subthalamic nucleus	脳の視床下部の核
	Th	B.thalamus	脳の視床
	Sp	Spinal cord	脊髄



(6)染色体位置

クローンのDNA塩基配列に対応する既知配列ライブラリーGenbank release122 及び 123 中のヒトゲノム配列に対して解析プログラムBLASTN 2.2.1 (「ギャップBLASTおよびPSI-BLAST: タンパク質データベース検索プログラムの新規作成」、前掲)を用いて検索した。又、クローンのDNA配列を、相同検索プログラムBLASTN 2.2.1を用いてヒトゲノムをコードするクローンのライブラリー(http://ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H_sapiens/)に対応させた。

その結果、本発明の遺伝子は2番目の染色体(2q21)に位置することが確認された。

(7) インビトロでの転写翻訳

インビトロでの転写翻訳系(プロメガ社,TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System cat.no.L1107)を用いて、cDNAクローンfj03204からの遺伝子産物を発現させた。

³⁵S標識メチオニンを取り込ませた産物を12.5%のSDS-PAGEで泳動した。ゲルを乾燥させ、BAS2000(Fujifilm)のシステムでオートラジオグラフィーをおこない、クローンfj03204の遺伝子産物を検出した。

その結果、77kDaのサイズマーカーに対応する位置に、クローンfj03204の転写翻訳産物と思われるバンドを確認した。

fj03204がコードするタンパク質は、最初のメチオニンから数えると698アミノ酸残基からなり、分子量は77,350kDaと予想され、実験結果はこれによく一致するものであった。

(8) 本発明遺伝子の機能

以上の、相同性、相同性遺伝子に関する情報、各種ドメイン、発現部位、及び染色体位置等に関するデータから以下のことが明らかとなった。

即ち、相同性検索及び機能ドメインの検索から、本発明のDNAまたは遺伝子はQuiescin Q6 Gene (QSCN 6)のファミリーと40%程度の相同性を有し、そのN末端領域にチオレドキシン(Thioredoxin)ドメインを有していることが明らかとなった。更に、非特許文献1及び非特許文献2に開示されたQuiescin Q6



Gene (QSCN 6) アミノ酸配列とのアライメントからも明らかなように、本発明の DNA または遺伝子の C 末端領域（配列番号 1 におけるアミノ酸 405～539 番目）には酵母の ERV 1 を有していることが判明した。これらのことから、本発明の DNA または遺伝子は非特許文献 1 及び非特許文献 2 等に記載された Quiescin Q6 Gene (QSCN 6) のファミリーに属すると推測することが出来る。

非特許文献 1 及び非特許文献 2 に記載されているように、ERV 1 遺伝子は酵母の酸化的リン酸化及び無性増殖に必須の遺伝子であり (Lisowsky, T. (1992), Mol. Gen. Genet., 232:58-64)、酵母ミトコンドリアゲノムの維持及び細胞分裂周期に重要な役割を担っていると考えられている (Lisowsky, T. (1994), Curr. Genet., 26:15-20)。

又、QSCN6 は活発に増殖している繊維芽細胞における発現は低く、静止期にある繊維芽細胞では高発現されている。QSCN6 の mRNA は繊維芽細胞が増殖期から静止期に移行し始めるときに、強く発現が誘導され、一方で、形質転換された繊維芽細胞においては抑制されていることが知られている (Coppock D. L. et al., (1993) Cell Growth Differ., 4:483-493)。

更に、このグループに属する幾つかの遺伝子は細胞外マトリックス (ECM) の成分である。ECM は細胞において構造的な役割を果たしているだけではなく、例えば、腫瘍抑制及び増殖調節のような機能的な役割も担っている。

以上のことから、QSCN6 は細胞接着における役割を担っている可能性がある。更に、正常細胞が可逆的静止期に入る過程において機能している可能性があり、この遺伝子の活性が阻害されることが癌化において或る役割を担っていることも考えられる。又、QSCN6 は細胞増殖の制御及び酸化還元状態に関わる役割を有するものと考えられる。

従って、当業者であれば、本発明の DNA または遺伝子が増齢に伴う疾患又は癌に深く関わる機能を有するものと推測することができる。

又、配列番号 1 に示されたクローン f03204 の塩基配列から明らかなように、翻訳開始コドン周辺の塩基配列 (AACATGG) が、Kozak の共通配列 (ACCA TGG) に良く一致している。更に、非特許文献 2 に記載されているように、QS



CN6は酵母ミトコンドリアのマトリックスに存在する蛋白質であるが、機能ドメインの検索から、クローンfj03204のN末端にも分泌に必要なシグナル配列（Sosi プログラム検出領域）が確認された。

以上の事実から、クローンfj03204は完全長の遺伝子をコードしているものと考えられる。

産業上の利用可能性

細胞或いは組織の成長は、増殖期にある細胞の分画、静止期にある細胞の分画、及び細胞死の割合によって決定される動的プロセスである。細胞の増殖期から静止期への移行の調整は、成長の調整全体において重大なステップであり、適切な静止期への移行の阻害が癌や他の増殖性疾患の特徴である。

従って、本発明により加齢に伴う疾患又は癌の診断及び治療に大きな進歩が期待される。

更に、本発明のDNAもしくは遺伝子またはそれらの一部の塩基配列に基づき作成した合成DNAプライマーを使用し、ヒトの血液または組織から抽出した染色体DNAを用いてPCRを行い、その産物の塩基配列を決定することにより、本発明のDNAまたは遺伝子中にある個体によって異なる一塩基の変異、即ちSNPを見出すことができる。これにより、個体の体質などが予測され、各個体に適した医薬の開発などが可能となる。

また、クロスハイブリダイゼーションにより、マウスなどのモデル生物における本発明のDNAまたは遺伝子に対するオルソログ(ホモログ、カウンターパート)遺伝子を単離し、例えば、これら遺伝子をノックアウトすることによってヒトの疾患モデル動物を作成し、ヒトの病因となる遺伝子を探索・同定することもできる。

本発明で得られた新規なDNAまたは遺伝子を所謂DNAチップなどに集積させ、このチップに、例えば、癌患者などの患者と対照としての正常人由来の血液または組織などから作製したプローブをハイブリダイゼーションさせることによって、これらの疾患の診断、治療などに役立てることができる。

また本発明ポリペプチドに対する抗体を網羅的に作製して配列させた抗体チッ



ブは、患者と正常人のタンパク質発現量の差異を検出するなどのプロテオーム解析から、病気の診断、治療などに役立てることができる。

更に、本発明のDNA又は遺伝子構築物はワクチンの活性成分として利用することができる。



請求の範囲

1. 以下の(a)または(b)のポリペプチド:

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、(a)のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド、
をコードする塩基配列を含むDNA。

2. 請求項1に記載のDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、請求項1(a)のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

3. 請求項1または2に記載のDNAを含む遺伝子構築物。

4. 以下の(a)または(b)のポリペプチド:

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において、一部のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、(a)のポリペプチドの機能と実質的に同質の生物学的活性を有するポリペプチド。

5. 請求項3に記載の遺伝子構築物にコードされる組換えポリペプチド。

6. 請求項4または5に記載のポリペプチドに対する抗体。

7. 請求項1または2に記載のDNAを配列させた、DNAチップ。

8. 請求項4または5に記載のポリペプチドを配列させたポリペプチドチップ。

9. 請求項6に記載の抗体を配列させた抗体チップ。

10. 請求項1又は2に記載のDNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド。

SEQUENCE LISTING

ggc gag gac gcc gtg tgg gtg ctg gac agc ggc agc gtg cgc ggg gcc 244
Gly Glu Asp Ala Val Trp Val Leu Asp Ser Gly Ser Val Arg Gly Ala
60 65 70

acc gcc aac agc tcg gcc gcg tgg ctc gtg cag ttc tac tcg tcg tgg	292
Thr Ala Asn Ser Ser Ala Ala Trp Leu Val Gln Phe Tyr Ser Ser Trp	
75 80 85 90	
tgt ggc cac tgc atc ggc tac gcg ccc act tgg cgg gcc ctg gct ggg	340
Cys Gly His Cys Ile Gly Tyr Ala Pro Thr Trp Arg Ala Leu Ala Gly	
95 100 105	
gat gtg cga gac tgg gcc agt gcc att cgc gtc gca gct ctg gac tgc	388
Asp Val Arg Asp Trp Ala Ser Ala Ile Arg Val Ala Ala Leu Asp Cys	
110 115 120	
atg gaa gag aag aac cag gcc gtg tgc cat gac tac gac atc cac ttc	436
Met Glu Glu Lys Asn Gln Ala Val Cys His Asp Tyr Asp Ile His Phe	
125 130 135	
tac ccc acc ttc cgg tat ttt aaa gca ttt aca aag gag ttt aca act	484
Tyr Pro Thr Phe Arg Tyr Phe Lys Ala Phe Thr Lys Glu Phe Thr Thr	
140 145 150	
gga gaa aat ttt aaa gga cct gac cga gag ctg cga aca gtc aga cag	532
Gly Glu Asn Phe Lys Gly Pro Asp Arg Glu Leu Arg Thr Val Arg Gln	
155 160 165 170	
acg atg att gac ttc ctg cag aac cac acg gaa gga agc cgg ccc cct	580
Thr Met Ile Asp Phe Leu Gln Asn His Thr Glu Gly Ser Arg Pro Pro	
175 180 185	
gcc tgc ccg cgc cta gac ccc att cag ccc agt gat gtt ctt tcc ctt	628
Ala Cys Pro Arg Leu Asp Pro Ile Gln Pro Ser Asp Val Leu Ser Leu	
190 195 200	
ctt gac aac cgt ggc agc cat tac gtg gct att gtc ttt gaa agc aac	676
Leu Asp Asn Arg Gly Ser His Tyr Val Ala Ile Val Phe Glu Ser Asn	
205 210 215	
agc tcc tac ctt gga cgg gag gtg atc tta gac ctg atc ccg tat gaa	724
Ser Ser Tyr Leu Gly Arg Glu Val Ile Leu Asp Leu Ile Pro Tyr Glu	
220 225 230	
agc atc gtg gtg acc cga gca ctg gac ggg gac aaa gca ttt ctg gag	772
Ser Ile Val Val Thr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Lys Ala Phe Leu Glu	
235 240 245 250	
aaa ctt ggt gtt tct tca gtc cct tcg tgt tac ctg atc tac cca aat	820
Lys Leu Gly Val Ser Ser Val Pro Ser Cys Tyr Leu Ile Tyr Pro Asn	
255 260 265	

3/6

ggg tcg cat gga ttg att aac gtc gtg aag cct ctg cgg gcc ttc ttt Gly Ser His Gly Leu Ile Asn Val Val Lys Pro Leu Arg Ala Phe Phe 270 275 280	868
tcg tct tat ttg aag tca ttg ccg gat gtg agg aaa aaa tcg ctt ccc Ser Ser Tyr Leu Lys Ser Leu Pro Asp Val Arg Lys Lys Ser Leu Pro 285 290 295	916
ttg cct gaa aag cca cac aaa gaa gaa aat tca gaa atc gtg gtt tgg Leu Pro Glu Lys Pro His Lys Glu Glu Asn Ser Glu Ile Val Val Trp 300 305 310	964
aga gaa ttt gac aag tcg aag ctg tac acg gtg gac ctg gag tca ggg Arg Glu Phe Asp Lys Ser Lys Leu Tyr Thr Val Asp Leu Glu Ser Gly 315 320 325 330	1012
cta cac tac ctc ctg cgg gtg gag ctg gca gcc cac aag tcc ctg gcc Leu His Tyr Leu Leu Arg Val Glu Leu Ala Ala His Lys Ser Leu Ala 335 340 345	1060
gga gca gag ctg aag acg ctc aag gac ttt gtg act gtc ttg gcc aag Gly Ala Glu Leu Lys Thr Leu Lys Asp Phe Val Thr Val Leu Ala Lys 350 355 360	1108
ctg ttc cct gga cgg ccg cca gtc aag aag ctg ttg gag atg ctg cag Leu Phe Pro Gly Arg Pro Pro Val Lys Lys Leu Leu Glu Met Leu Gln 365 370 375	1156
gag tgg ctg gcc agc ctt ccc ctg gac agg atc ccc tac aac gcc gtg Glu Trp Leu Ala Ser Leu Pro Leu Asp Arg Ile Pro Tyr Asn Ala Val 380 385 390	1204
ctt gac ctg gtc aac aac aag atg cgg att tct gga ata ttc ctt act Leu Asp Leu Val Asn Asn Lys Met Arg Ile Ser Gly Ile Phe Leu Thr 395 400 405 410	1252
aat cac ata aag tgg gtt gga tgt caa gga agc cga tct gag ttg agg Asn His Ile Lys Trp Val Gly Cys Gln Gly Ser Arg Ser Glu Leu Arg 415 420 425	1300
ggt tac ccg tgt tct ctc tgg aaa ctg ttc cac act ttg act gtt gaa Gly Tyr Pro Cys Ser Leu Trp Lys Leu Phe His Thr Leu Thr Val Glu 430 435 440	1348
gcc tcg acc cac cca gat gca ctg gtt ggc aca ggc ttt gaa gac gac Ala Ser Thr His Pro Asp Ala Leu Val Gly Thr Gly Phe Glu Asp Asp 445 450 455	1396

ccc cag gct gtg ctg cag aca atg agg agg tac gtt cac acc ttc ttt Pro Gln Ala Val Leu Gln Thr Met Arg Arg Tyr Val His Thr Phe Phe 460 465 470	1444
ggg tgt aag gaa tgt ggt gag cac ttt gag gaa atg gct aaa gaa tcc Gly Cys Lys Glu Cys Gly Glu His Phe Glu Glu Met Ala Lys Glu Ser 475 480 485 490	1492
atg gac tcg gtg aaa acc cca gac caa gcc atc ctc tgg ctg tgg aag Met Asp Ser Val Lys Thr Pro Asp Gln Ala Ile Leu Trp Leu Trp Lys 495 500 505	1540
aag cat aat atg gtg aac ggc cgc ctg gca ggc cat ctg agt gag gat Lys His Asn Met Val Asn Gly Arg Leu Ala Gly His Leu Ser Glu Asp 510 515 520	1588
ccc cgg ttt cca aag ctt cag tgg ccc act ccg gac ctc tgc cca gcc Pro Arg Phe Pro Lys Leu Gln Trp Pro Thr Pro Asp Leu Cys Pro Ala 525 530 535	1636
tgc cat gag gaa att aag ggc ctg gcc agc tgg gat gaa ggc cac gtg Cys His Glu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Ser Trp Asp Glu Gly His Val 540 545 550	1684
ctc aca ttc ttg aag cag cac tat ggc cgc gac aac ctc tta gac acg Leu Thr Phe Leu Lys Gln His Tyr Gly Arg Asp Asn Leu Leu Asp Thr 555 560 565 570	1732
tat tcc gca gac cag ggg gat tcc agt gaa gga gga acc ctg gcc agg Tyr Ser Ala Asp Gln Gly Asp Ser Ser Glu Gly Gly Thr Leu Ala Arg 575 580 585	1780
ggt gag gaa gag gag aaa aga ctc act ccc cca gag gtg tcc cat gga Gly Glu Glu Glu Glu Lys Arg Leu Thr Pro Pro Glu Val Ser His Gly 590 595 600	1828
gac cga gac acc cag agc gtc cgt cca cct ggt gca ctg ggc ccc agg Asp Arg Asp Thr Gln Ser Val Arg Pro Pro Gly Ala Leu Gly Pro Arg 605 610 615	1876
cct gcc ctt cca gag agc ttg cat cac agc ttg gac ggg aaa ctc cag Pro Ala Leu Pro Glu Ser Leu His His Ser Leu Asp Gly Lys Leu Gln 620 625 630	1924
agt ctg gat ggg ccc ggg gcc cac aag gag gtg ggc ggg gcc gca ccc Ser Leu Asp Gly Pro Gly Ala His Lys Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro 635 640 645 650	1972



ttc ctc ggg gtt gac ttc tcc agc ctg gac atg agt ctc tgt gtc gtg	2020
Phe Leu Gly Val Asp Phe Ser Ser Leu Asp Met Ser Leu Cys Val Val	
655 660 665	
ctg tac gtg gct tca tcc ctg ttc ctc atg gtg atg tac ttc ttc ttc	2068
Leu Tyr Val Ala Ser Ser Leu Phe Leu Met Val Met Tyr Phe Phe Phe	
670 675 680	
cgg gtg agg tcc agg cgg tgg aag gtc aag cac cac cac ccg gcc gtg	2116
Arg Val Arg Ser Arg Arg Trp Lys Val Lys His His His Pro Ala Val	
685 690 695	
tga gtgcccgggt gctgccagcc acggcggaag ctcccttgga ggcagccctg	2169
ccccgtgcca cctgcagctt taatatttat gatcagggat tttataaaca tgcgggcctg	2229
gtttcacatc ggatggcacc ttttggttc aaagtcctgg tttacaaac gctcttctaa	2289
caagggaaga acacggggta attttgtggg gatatttgca ttcttgccgt actcaagtct	2349
gttcatgctc cttttgcagg tcttacagca aaaagacttc tgtattttta ctcttctaga	2409
tgtgaaaaga ggggtgcagag tccaggccag atagtcttcc ccacacactt tcatctcggt	2469
tcctccactc cgccccatcc tgcagggcct tgtttttgta ttgggagaac ctgccccatc	2529
ccccccggg ctccctggctc ccccccccc caccttgccc ctccctgcac cctccactcc	2589
cctcgctccc cctccccccg ctccccccac gcccctgct ccaggtgcc aagtgttttc	2649
ctttagccgg gcggggacag acagagccgg aagcgcagtc ggcctctgca gccctccaa	2709
gcaagtgctc cagggactat cctgtgtttg tagctgcttc cctagggcag gttcctgagg	2769
gctctccttg ttctccggg ttttcgacac cagacgtggg gatttcaaca ggggaggagc	2829
caaggaattc tgtggctgtg ctgcgtttca gaaaataacc ccagaggcc ttgggctgtg	2889
gacctggggg ttggaaggat gggggctcat ttaaccctca gaggcagcgc ctttgtctgt	2949
ctatctgggtg acaagagaga gacaagtaaa tggggccgt tgggacggcg ggtgcctgga	3009
gggcagctct gggctcagcg ggcagtgtt agagcacagg cccctctgtt ggggatggg	3069
gaggagagca gtctgccctt gggagcgtag gcccaggga gacttctaaa gccccccctg	3129
tcgtctgctc ttacccagc accacagagg cacctgtgc acacacaagc atctcactcg	3189

gcccacggag ggggccaggc ttcctttgcc tgaagctgtt ttgggaaggg tctccacaca 3249
ggcactgac tccaagctt tggatcatg gtcttttacc atttgataat tttaaacatt 3309
gtttttaaac ccaaaacatt tagtggtccg ttgcctctga agatgtaac aaacaaatac 3369
actatttctg ggaacattta tattgagatt ctttgggt attggtgtgt ctcacaggca 3429
aaatttgatt tggctaaaat aggctcagat gtatttgtgt gccgtgtgt gtgtgtgtgt 3489
gtgtgtgtgt gtgtgtgtat gagagagaga gagactttga cggtttaga tattttttcc 3549
gctttgccta ctttatgtt tataatcatg tgtttactaa caagtgtatg acatggatgt 3609
attcataaga ccatgtaata ttgatgtat tgtgtcgt tgagaaaaaa aggcaacagc 3669
tgattcttc aacaactgtc acagaatggc tgggctgaga acgtgccca gggccctgca 3729
gctggcggga gaggtgtctg gtgggagcgg tgtctggtgc gtcagcctgc tgcctcgtgt 3789
ctcactcag agttgcttct ggtttcacac ttttaaccc ctctgtgctt tagcagcgt 3849
gaccttgctt tcattgcttc atccagtga gccctgggtt attgaagaca ccaaagtgtt 3909
tctcttcag tttgaaaacc aggcaggtt acacgtgggt ttcagtgtat ttgcctttga 3969
acccttcaa ctaaacatt gccttttggc tgggtgtgaa tgtctttagc tggggtgacc 4029
tggagtgacc tgggacggtt ttgtggtta ccgtctccag cttcagcctt tccagaaacc 4089
cttgtggagg gcagtgttg ctgcaggtt catcatattg cagtttgagg tcaccactat 4149
ttggggaaca agcttgctc ctgctgagg gcaggatttt cagcagagcg tcggtggggc 4209
tgggccgtcg tggaggtggc cccaggagtc atatggccat actcagacac acctgtgtg 4269
gcctgctcag agctggatgc cacctttagg caatgtttag agtctatitt ctaaagttt 4329
aagtatttta agaggtattg agactaatga atataatag tcagtaattt aaatgcttat 4389
ttattttcag tggaaggatt tttattaaaa agaagctaata tgacatggaa atgtcagtga 4449
aatttcttac ctgcaaggaa agtgaacatt ttgtatttaa gtaaacata atgtgcacat 4509
tttaataaag aaatctgaca ttig 4533

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12M1/00, G01N33/53,
G01N37/00//C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12M1/00, G01N33/53,
G01N37/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Coppock D.L. et al., The Quiescin Q6 Gene (QSCN6) Is a Fusion of Two Ancient Gene Families: Thioredoxin and ERV1, Genomics, 1998, Vol.54, No.3, pages 460-8	1-10
A	WO 98/17798 A1 (Amgen Inc.), 30 April, 1998 (30.04.98), & EP 0934413 A & JP 2001-503255 A	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 December, 2003 (10.12.03)

Date of mailing of the international search report
24 December, 2003 (24.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12M1/00, G01N33/53, G01N37/00 // C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12M1/00, G01N33/53, G01N37/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Coppock D. L. et al., The Quiescin Q6 Gene (QSCN6) Is a Fusion of Two Ancient Gene Families: Thioredoxin and ERV1, Genomics, 1998, Vol.54, No.3, Pages 460-8	1-10
A	WO 98/17798 A1 (Amgen Inc.) 1998.04.30 & EP 0934413 A & JP 2001-503255 A	1-10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.12.03

国際調査報告の発送日

24.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448